

Методи та прилади контролю якості, № 12, 2004

МЕТОДИ ОЦІНКИ БІОЛОГІЧНОГО ЗАБРУДНЕННЯ НАФТОПРОДУКТІВ

© Кучма Н. М., 2004

Інститут транспортних технологій (м. Київ)

© Бойченко С. В., 2004

Національний авіаційний університет (м. Київ)

Вказано, що всі методи оцінки біологічного ураження нафтопродуктів можна класифікувати на дві групи: довготривалі і експрес-методи. Домінуючими методами є довготривалі, основними недоліками яких є їх складність і трудомісткість. Для оцінки біологічного забруднення авіаційних палив важливими є експрес-визначення оперативної методики тестування авіаційних палив на біологічне ураження. Пропонується ввести показник „наявність мікрофлори” до переліку показників, що характеризують якість авіаційного палива

В даний час відомі різні види втрат нафтопродуктів [1]. На нашу думку, біологічне ураження можна віднести до якісно-кількісних втрат. У цій проблемі важливим є визначення ураження нафтопродуктів різними мікроорганізмами.

Метою данної статті є аналіз, систематизація і класифікація методів оцінки біологічного ураження нафтопродуктів. Нафтопродукти можуть бути забруднені мікробіологічними забрудненнями при зберіганні, транспортуванні і безпосередньому використанні. Особливо є нестійкими до мікроорганізмів палива для повітряно-реактивних двигунів.

Забрудненість нафтопродуктів мікроорганізмами залежить у першу чергу від технологічного рівня культури їх використання. Наприклад, постійне використання забрудненого палива може призвести до серйозних наслідків. Розростаючись, біомаса забиває фільтри, паливопровод, відбувається розрідження палива і змашувальних матеріалів, корозія металу, що може стати причиною аварій [2]. Отже, дуже важливо завчасно виявити біозабруднення палив, а також попередити його розповсюдження.

У даний момент немає загальноприйнятого способу визначення забрудненості палив мікроорганізмами. Ступінь біоураження палив можна встановити за інтенсивністю росту мікроорганізмів, що окиснюють вуглеводні у водно-паливному середовищі [2]. Методи, що тепер застосовуються, основані або на підрахунку загального числа і життєздатності мікроорганізмів в різних нафтопродуктах, або на спостереженнях у лабораторних умовах за їх розвитком у поживних середовищах з додаванням нафтопродукту. Ні той, ні інший спосіб не дають досить

повного уявлення про ступінь ураження нафтопродуктів.

Будь-який метод визначення ураження нафтопродукту вимагає, крім підбору активних культур мікроорганізмів і умов дослідження, простого, надійного і швидкого способу виявлення мікроорганізмів, оцінки їх чисельності або інтенсивності росту в системах з паливом. Зазвичай інтенсивності росту в поживних середовищах і число мікроорганізмів у будь-якому субстраті визначають за числом клітин або за біомасою в одиниці об'єму. Число мікроорганізмів в одиниці об'єму можна визначити або безпосереднім підрахунком клітин під мікроскопом (у рахункових камерах, на фіксованих пофарбованих мазках або на мембранних фільтрах), або спостерігаючи за їх ростом на густих (чашковий метод) або рідких (метод граничних розведень) поживних середовищах. Крім того, свідчити про ступінь росту мікроорганізмів можна за результатами підрахунку їх біомаси ваговим або деякими хімічними методами. Концентрацію бактеріальних клітин у рідких середовищах встановлюють також шляхом порівняння мутності досліджуваної суспензії з рядом стандартних еталонів, що містять заздалегідь відоме число клітин. Вибір того чи іншого методу визначається особливостями досліджуваних мікроорганізмів: характером росту, розмірами кліток, густиною суспензії тощо, а також властивостями субстрату.

У системах з паливами підрахунок мікроорганізмів проводять тими ж методами, що і на середовищах з сумішшю рідких вуглеводнів. Як правило, тут потрібно враховувати кількість біомаси, що утворилася, або число клітин мікроорганізмів. Але це важко здійснити через наявність двох фаз у середовищі (мікроорганізми розподіляються не тільки у

водній, але й частково у вуглеводневій фазі). Тому для підрахунку числа клітин (кількості біомаси) придатні не усі з вищевказаних методів. Ті методи, які можуть бути використані, як правило, вимагають проведення додаткових операцій, пов'язаних з відділенням клітин від вуглеводнів.

Метод безпосереднього підрахунку числа клітин під мікроскопом для визначення чисельності мікроорганізмів у середовищах з рідкими вуглеводнями або нафтопродуктами використовується дуже рідко, насамперед через наявність емульсії і нерівномірного розподілу кліток у культуральному середовищі. Крім того, серед мікроорганізмів, що уражають нафтові палива, багато дрібних форм (представники *Mycobacterium*, *Pseudomonas* та ін.), які підрахувати в рахункових камерах є неможливим.

Метод обліку мікроорганізмів на фіксованих пофарбованих мазках також мало придатний для культур, що ростуть на середовищах з вуглеводнями, оскільки емульсія не розподіляється рівномірно по предметному склу і приготувати препарат строго визначеної площі не завжди є можливим. Однак, якщо водний шар досить великий і паливо не перемішується, цей метод може бути використаний для визначення числа бактерій у водному шарі [3].

Метод фільтрації через мембранні фільтри з наступним фарбуванням кліток на фільтрі і підрахунком їх числа під мікроскопом є досить зручним для обліку мікроорганізмів, які містяться в нафті. Цей спосіб може бути використаний для визначення чисельності мікроорганізмів і у водно-паливних середовищах (у цьому випадку доцільно фільтрувати обидві фази), однак він не може бути застосований при високих густинах суспензій.

Методи безпосереднього підрахунку мікроорганізмів під мікроскопом дають можливість найбільш точно визначати число мікроорганізмів у субстраті, але не дозволяють розмежувати живі і мертві мікроорганізми. Важливо у системах з паливами знати чисельність життєздатних мікроорганізмів. Тому при дослідженні палив і “водних подушок” часто використовують метод підрахунку шляхом висіву на густі середовища, що дозволяє не тільки визначити кількість живих клітин у субстраті, але й оцінити різноманітність мікроорганізмів (по морфології колоній). У більшості випадків при цьому приходиться застосовувати різні за складом поживні середовища, що дає можливість виявити більш широкий спектр мікроорганізмів, що відносяться до різних фізіологічних груп.

Висів на різні середовища був використаний, наприклад, при дослідженні мікрофлори водних подушок з резервуарів з реактивним і дизельним паливами, що перебували на тривалому збереженні в

умовах субтропічного клімату [3]. Стерильно відібрані проби водного шару після ряду розведень висівали на м'ясо-пептонний агар (МПА), суслівий агар (СА) і на мінеральне середовище з сахарозою (середовище Чапека). Застосування цих середовищ дозволило встановити, що серед виділених бактерій найбільшу частину складають представники родів *Mycobacterium* і *Pseudomonas*, із грибів — *Cladosporium* і *Apergillus*. Однак відомо, що не всі мікроорганізми, що виділяються на звичайних середовищах із систем з паливом, розвиваються саме за рахунок палива. Значна частина мікроорганізмів, що виявлені у водних подушках, росте, використовуючи продукти життєдіяльності вуглеводнеокинюючих бактерій і грибів. Тому для визначення первинної мікрофлори, що розвивається за рахунок палива, необхідно перевіряти виділені мікроорганізми на здатність до росту в середовищах з паливами. Для цієї мети пропонується, наприклад, робити висіви на агар з моторним паливом або на агар з фільтрувальним папером, що просочений паливом. В останньому випадку фільтри рекомендується встановлювати на дно чашечок Петрі. Іноді застосовують просочені паливом пластинки силікагелю.

Метод визначення чисельності мікроорганізмів висівом на густі середовища надає важливу інформацію про різноманітність і зміну кількості життєздатних форм у досліджуваному субстраті. Однак істотним недоліком методу є розподіл мікробних клітин як у водній фазі, так і в паливі, що не дозволяє приготувати точні суміші і провести кількісний посів. Мікрофлору кожної фази приходиться враховувати окремо, тому даний метод придатний в основному для дослідницьких цілей, але незручний для масових випробувань. Проте іноді він використовується для перевірки дії біоцидів у системах з паливами [4].

Виявлення й облік числа життєздатних мікроорганізмів у нафтових фракціях і супутніх водах нерідко здійснюють за допомогою фільтрування визначеної кількості досліджуваної рідини через мембранні фільтри [2]. Фільтри по закінченні роботи рекомендується стерильно обробляти фізіологічним розчином, а якщо паливо включає біоцидні присадки, то і розчином детергенту. Потім клітини, що залишилися на фільтрі, підросшують на агаризованих середовищах, розташовуючи фільтри в чашки Петрі і візуально підраховують число колоній, що вирости. Для виявлення дріжджів і міцеліальних грибів фільтри поміщають на СА, що містить інгібітори росту бактерій: пеніцилін, хлорамфенікол, хлортетрациклін. При підрахунку *Cladosporium resinae* рекомендується для зменшення росту бактерій доводити значення рН до 3,5, чи додавати розчин крео-

зоту. Для підрахунку бактерій фільтр розташовують, наприклад, на поверхні МПА, а іноді додатково заливають зверху тонким шаром середовища тієї ж сполуки з 2,3,5-трифенілтетразолієм хлористим (ТТХ). Речовини, що редукуються бактеріями, відновлюють ТТХ і середовище навколо колоній офарблюється в червоний колір, що полегшує підрахунок бактерій. Обсяг аналізованих проб визначається експериментально і може змінюватися від 1 мл для сильно забрудненого палива до декількох літрів, коли забрудненість невелика [3].

Іноді пропонують більш складні модифікації викладеного методу [3]. Так, для виявлення мікроорганізмів у зразках авіаційного палива фільтр після фільтрації асептично розрізають на 6 секторів. Кожен сектор переносять в стерильне мінеральне середовище, енергійно струшують, заливають паливом і витримують при температурі 30, 37 і 40 °С. Потім для виявлення бактерій і грибів з мінерального розчину роблять висів на відповідні поживні середовища.

Для підрахунку кількості життєздатних мікроорганізмів у різних емульсіях, у тому числі в сумішах нафтопродуктів з водою, рекомендують застосовувати експрес-метод з використанням скелець занурення. Метод зручний тим, що немає необхідності досліджувати різні фази в сумішах або домагатися однорідності матеріалу, що, як вказувалося, у системах з паливами не завжди є можливим. Крім того, він відрізняється швидкістю, достатньою легкістю виконання і дозволяє визначити число життєздатних форм в емульсії в межах від $1 \cdot 10^3$ до $1 \cdot 10^5$ клітин в 1 мл. В основі цього методу є класичний метод скелець обростання, що застосовується для дослідження ґрунтових мікроорганізмів [5]. При використанні методу скелець занурення стерильні предметні скельця покривають тонким шаром агаризованного поживного середовища, занурюють на визначений час у досліджувану емульсію, а потім переносять у чашки Петрі і витримують у термостаті протягом доби. Кількість мікроорганізмів визначають підрахунком числа колоній на агарі з наступним перерахуванням на визначений об'єм за допомогою спеціальних кривих. Використання неоднакових середовищ дозволяє виявляти різні мікроорганізми.

Ріст мікроорганізмів за рахунок різних видів палива або індивідуальних вуглеводнів особливо часто оцінюють за масою сухої біомаси [6, 7]. В основному цей методом використовують під час роботи з чистими культурами. При цьому біомасу відокремлюють від культуральної рідини різними способами.

Під час підрахунку бактерій і дріжджів найчастіше використовують фільтрування через мембранні фільтри, яке проводять під вакуумом. Цей метод

використовують при підрахунку мікобактерій і нocardій, що, на відміну від багатьох інших бактерій, розподіляються в культуральній рідині особливо нерівномірно, так як частина з них легко спливає разом з вуглеводнем [8]. Чим більший розвиток мікрофлори і чим більше обсяг відфільтрованої проби, тим вище точність результатів.

Визначення біомаси міцеднальних грибів не представляє особливих труднощів. Міцелій, вирощений у невеликому обсязі середовища, зручно відокремлювати на мембранних фільтрах під вакуумом [9]. Коли міцеліальна маса велика, застосовують просте фільтрування через паперові фільтри відповідного розміру. Іноді міцелій гриба виділяють з культуральної рідини вигнутим ніхромовим дротом, що взагалі виключає необхідність фільтрування. У цьому випадку біомасу переносять у підготовлений бюкс.

Відділену від культуральної рідини біомасу відмивають від солей розведеною соляною кислотою і дистильованою водою, а від вуглеводнів – хлороформом або петролейним ефіром. Остання операція веде до втрат біомаси, тому що зазначені розчинники екстрагують деякі компоненти клітин. Однак для підрахунку біомаси в лабораторних дослідженнях повне видалення з неї вуглеводнів не обов'язкове, особливо, якщо біомасу відокремлювати від субстрату за допомогою фільтрів. Біомасу, зібрану на мембранних фільтрах, доводять до постійної ваги при температурі 70–80 °С.

Метод визначення маси сухої біомаси мікроорганізмів на середовищах з вуглеводнями за допомогою мембранних фільтрів дає цілком задовільні результати і тому отримав широке застосування в дослідницькій практиці. Однак він вимагає великої витрати часу і для масових експрес-випробувань незручний.

Існує думка [2], що про присутність у паливі мікроорганізмів можна судити за кількістю в його складі мікробного білка. При використанні цього методу рекомендується відокремлювати біомасу від палива (наприклад, фільтруванням через мембранний фільтр), а потім суспендувати її в дистильованій воді, де і проводити визначення білка кліток. Метод може бути використаний для оцінки росту мікроорганізмів за рахунок палива.

Контроль за ростом мікроорганізмів у водно-паливних системах можна здійснювати не тільки шляхом обліку числа кліток або їх біомаси, але за тими змінами, які вони викликають у середовищі. Такий підхід до оцінки біоураження нафтопродуктів є досить доцільним у зв'язку з тим, що зміни в субстраті не завжди корелюють з кількістю мікробної маси, що утворилася. Нерідко при активному рості

мікроорганізмів ті чи інші показники якості субстрату змінюються мало, у той час як низький зміст мікроорганізмів у ряді випадків може завдати неоправданної шкоди нафтопродукту.

Функції мікроорганізмів можна враховувати за споживанням компонентів середовища, за виділенням продуктів життєдіяльності, за зміною фізико-хімічних властивостей субстрату (у випадку палив – це в'язкість, змашувальні властивості, емульгування, кислотність тощо). Такий контроль припускає необхідність проведення спеціальних досліджень щодо виявлення мікрофлори, що вражає паливо, і вивчення її фізіолого-біохімічних ознак.

Окиснення вуглеводнів мікроорганізмами відбувається за участю кисню повітря. Тому одним з методів оцінки враження палив може бути підрахунок споживання кисню з середовища. Швидкість мікробіологічного окиснювання нафти в перколяторній колонці, заповненій гравієм, автори праці [3] враховували за споживанням кисню за допомогою автоматичного респіратора, що працює в безперервному режимі.

Крім того, ріст мікроорганізмів за рахунок вуглеводнів можна оцінити за споживанням із середовища азоту [3].

Існує також метод аналізу вуглеводнів нафти і нафтопродуктів, що дозволяє виявляти зміни, що відбуваються під дією мікроорганізмів у складі нафти, її фракцій, палив і т.д. Метод припускає інкубацію визначеного виду мікроорганізму в мінеральному середовищі з нафтопродуктами (0,1 % об.) і наступну екстракцію вуглеводнів і продуктів їх деградації. Отриманий екстракт піддають хроматографічному поділові на колонках з різними наповнювачами і розчинниками. Застосування газорідинної хроматографії і мас-спектрометрії дозволяє визначити склад отриманих фракцій. Цей метод дозволяє чітко охарактеризувати активність мікроорганізмів, що окислюють вуглеводні, але через складність не може бути використаний при масових дослідженнях.

Відомо, що багато мікроорганізмів виділяють в середовище відновники, що легко виявити відповідними індикаторами. За ступенем зміни кольору індикатора можна судити про вміст бактерій у субстраті. Так, для швидкого контролю за кількістю

бактерій в маслах і паливах можна використати ТТХ, який у присутності відновника перетворюється у нерозчинний червоний пігмент формаза [3]. У середовищі з ТТХ додається певна кількість нафтопродукту, протягом 10–12 год інкубується при 30 °С і через порівняння інтенсивності офарблення дослідних проб з контрольними визначається концентрація бактерій.

Методи визначення вмісту бактерій у субстраті за допомогою ТТХ відносяться до експрес-методів: результати реєструються вже через кілька годин після змішування реагентів. Однак варто мати на увазі, що деякі мікроорганізми зовсім не виділяють відновників або виділяють них у дуже незначних кількостях. Крім того, на відновлення індикаторів можуть впливати компоненти досліджуваного субстрату, внаслідок чого швидкість відновлення індикатора не завжди відповідає дійсній кількості бактерій у середовищі. Тому оцінка росту бактерій цим способом є не зовсім якісною.

Десульфатуючі бактерії у процесі життєдіяльності виділяють сірководень, який, вступаючи у реакцію з важкими металами, утворює чорний осад сульфідів. Запропоновано [3] спосіб оцінки кількості десульфатуючих бактерій у складі масел і палив за інтенсивністю почорніння відповідного середовища. При дотриманні визначених умов результати можуть бути зареєстровані через 12–16 год.

Японськими вченими [10] було розроблено спосіб виявлення мікроорганізмів, сутність якого полягає у тому, що речовина, в якій можуть бути присутні мікроорганізми, запаковують в упаковку, в цілому непроникною та складається з прошарку (А) матеріалу, який є непроникним для мікроорганізмів, але проникним для повітря, і матеріалу (Б) непроникного для повітря. Потім матеріал (Б) прошаркової частини упаковки знімають, залишаючи упаковку непроникною для мікроорганізмів, але проникною для повітря. Далі упаковку витримують в умовах, які сприяють розмноженню мікроорганізмів, встановлюють наявність чи відсутність розмноження.

Таким чином, проведений вище аналіз літературних джерел, показав, що усі методи оцінки біологічного ураження палив можна класифікувати на дві групи: довготривалі і експрес-методи (рис.1).



Рис. 1. Узагальнена класифікація методів оцінки біологічного ураження нафтопродуктів

Для визначення біологічного ураження різних нафтопродуктів, а також для проведення протимікробних заходів і у деяких інших випадках висока точність обліку мікроорганізмів, як правило, не потрібна. Для зазначених ситуацій часто застосовують візуальний контроль за розвитком мікроорганізмів. Так, про ріст *Cladosporium resinae* у середовищах з авіаційним паливом можна свідчити за обсягом і товщиною міцеліальної плівки [3].

Вивчення існуючих методів оцінки біологічного ураження дозволило сформулювати висновок про те, що домінуючими методами є довготривалі, основними недоліками яких є їх великі складність і трудомісткість.

На даний час до методів оцінки і прогнозування будь-яких параметрів або властивостей висуваються такі вимоги, як: достовірність та відтворюваність, чутливість до зміни властивостей, точність, простота і універсальність [11]. Взагалі світова тенденція розвитку методів оцінки і прогнозування властивостей продуктів переробки нафти характеризується комплексним поєднанням перерахованих вимог разом із значним зменшенням часу, необхідного на проведення аналізу. Тобто перспективними методами є експрес-методи.

Особливо важливим є експрес-визначення біологічного забруднення авіаційних палив, кондиційність яких пов'язана із безпекою польотів [12]. Оперативне визначення чистоти авіаційного палива як за показниками вмісту механічних домішок і води, так і за наявністю мікрофлори є важливим момен-

том у технології контролю якості авіаційних паливно-мастильних матеріалів під час проведення лабораторного (оперативного) і аеродромного аналізів. Для цього, на нашу думку, доцільним є розробка оперативної ефективної методики тестування авіаційних палив на біологічне ураження. З метою практичної реалізації розробленої методики необхідним є введення показника „наявність мікрофлори” до переліку показників, що характеризують якість авіаційного палива.

1. Бойченко С. В. *Раціональне використання вуглеводневих палив: Монографія.* – К.: НАУ, 2001. – 216 с. 2. Литвиненко С. Н. *Защита нефтепродуктов от действия микроорганизмов.* – М.: Химия, 1977. – 139 с. 3. Гречушкина Н. Н., Азова Л. Г., Мыльникова С. И. *Методы оценки поражаемости нефтяных топлив микроорганизмами* // Биологические науки. – 1980. – № 2. – С. 15–25. 4. Работнова И. Л., Вишнякова Т. П., Гречушкина Н. Н., Власова И. Д., Нетте И. Т., Максимова И. В., Козлова Е. И., Крылов И. Ф. *Методика лабораторных испытаний антимикробной активности добавок к нефтяным топливам* // Биологические повреждения строительных и промышленных материалов. – 1973. – №. – С. 32–35. 5. Красильников Н. А. *Методы изучения почвенных микроорганизмов и их метаболитов.* – М. – 1966. – 142 с. 6. Крейн С. Э., Бессмертный К. И., Нетте И. Т., Гречушкина Н. Н. *Изменение некоторых свойств нефтяных топлив под действием микроорганизмов* // Прикл. биохимия и микробиоло-

гия. – 1969. – № 2. – С. 235–237. 7. Егоров Н. С., Вишнякова Т. П., Гречушкина Н. Н., Власова И. Д., Мыльникова С. И., Азова Л. Г. Поражаемость микроорганизмами нефтяных дистиллятных топлив и их защита // Биологические повреждения строительных и промышленных материалов. – К.: Наукова думка. – 1978. – 267 с. 8. Никитина К. А., Гречушкина Н. Н. К методике учета количества микроорганизмов при развитии на средах с жидкими углеводородами // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология и почвоведения. – 1965. – № 5. С. 23–27. 9. Виш-

някова Т. П. Биологические поражения нефти и нефтепродуктов и их защита при транспортировании и хранении. – М., – 1977. – 52 с. 10. Пат. 2719838 В2 3297397 А Япония. Заключение о присутствии микроорганизмов. – Заявл. 18.04.90; Оpubл. 25.02.98. 11. Абдуллаев А. А. Контроль в процессах транспорта и хранения нефтепродуктов. – М.: Недра, – 1990. – 263с. 12. Козаченко А. И. Контроль качества горюче-смазочных материалов в гражданской авиации. – К.: КИИГА, – 1992. – 244 с.

УДК 621.396.001